

## 明細書

## 子宮内膜症関連疾患の診断方法

BEST AVAILABLE COPY

5

## 技術分野

この出願の発明は、子宮内膜症関連疾患の分子生物学的な診断方法に関するものである。またこの出願の発明は、子宮内膜症関連疾患の分子メカニズムを利用した当該疾患の治療薬および治療方法に関するものである。

10

## 背景技術

子宮内膜症は一般的な産婦人科疾患であり、生殖可能年齢にある全女性の10%に影響している（非特許文献 1）。子宮内膜症の組織は正所性子宮内膜のように周期的な増殖と崩壊を経て、周期的月経困難症、性交疼痛症、骨盤痛、および月経時血尿の原因になる。さらに不妊症患者の 30~40%がこの疾患を有していることも報告されている（非特許文献 2）。一部の患者で子宮内膜細胞が転移し、異所的に増殖する際のメカニズムは未だに不明であるが、炎症性サイトカインの脱調節化が子宮内膜症の進行に寄与している可能性がある（非特許文献 3、4）。事実、単球の活性化と腹腔内への移動が、子宮内膜症において最も一貫して報告されている免疫学的異常性の一つとなっている（非特許文献 5~8）。

ダイオキシンは内分泌攪乱物質の一種であり、環境中に遍在している。3,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD; ダイオキシン) はダイオキシン群の中でも最も毒性が高い物質であり、各種の毒性効果（例えば、免疫毒性、血液毒性、催奇形性、および発ガン性など）を有している（非特許文献 9、10）。TCDD および関連化合物が誘導する遺伝子発現の変化は、毒素がアリル炭化水素受容体 (AhR) に結合した時点で開始され、次にアリル炭化水素受容体核トランスロケーター (ARNT) と二量体を形成して、XRE (異物応答配列) モ

チーフを含む遺伝子調節要素と相互作用する複合体を形成する（非特許文献 11、12）。サルを TCDD に慢性曝露させると、用量依存的に軽度から重度の子宮内膜症が発現したことから（非特許文献 13）、ダイオキシンと子宮内膜症の関連性について幾つかの研究が行われた（非特許文献 14～18）。しかしながら  
5 TCDD 曝露は子宮内膜症に相関しないと言う結果が最近報告され（非特許文献 19、20）、ダイオキシン曝露と子宮内膜症の関連性は不明のままとなっている。

なおこの出願の発明者らは、IgE 依存性ヒスタミン放出因子（Histamine Releasing Factor:HRF）を含む TCDD 標的遺伝子を同定している（非特許文献  
10 21～23）。しかしながら、このような TCDD 標的遺伝子産物としての HRF と子宮内膜症との関係は一切知られていない。

非特許文献 1： Wheeler J.M. J. Reprod Med. 1989, 34(1):41-6

非特許文献 2： Candiani G.B. et al. Obstet Gynecol. Surv. 1991,  
15 46(6):374-82

非特許文献 3： Garcia-Velasco J.A. and Arici A. Fertil Steril. 1999,  
71(6):983-93

非特許文献 4： Barcz et al. Med. Sci. Monit. 2000, 6(5):1042-6

非特許文献 5： Jolicoeur C. et al. Am. J. Pathol. 1998, 152(1):125-33

20 非特許文献 6： Lebovic D.I. et al. Fertil Steril 2001, 75(1):1-10

非特許文献 7： Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6):1949-54

非特許文献 8： Blumenthal R.D. et al. Am. J. Pathol. 2000, 156(5):1581-  
8

非特許文献 9： Chapman D.E. and Schiller C.M. Toxicol Appl.  
25 Pharmacol. 1985, 78(1):147-57

非特許文献 10： McGregor D.B. et al. Environ Health Perspect. 1998, 106  
Suppl 2:755-60

非特許文献 11： Sagawa K. and Fujii-Kuriyama T. J. Biochem. (Tokyo)  
1997, 122(6):1075-9

30 非特許文献 12： Nebert D.W. Crit. Rev. Toxicol. 1989, 20(3):153-74

- 非特許文献 13 : Rier S.E. et al. Fundam. Appl. Toxicol. 1993, 21(4):433-41
- 非特許文献 14 : Gibbons A. Science 1993, 262(5183):1373
- 非特許文献 15 : Obsteen K.G. and Sierra-Rivera E. Endocrinol. 1997, 15(3):301-8
- 非特許文献 16 : Bruner-Tran K.L. et al. Gynecol. Obstet. Invest. 1999, 48 Suppl. 1:45-56
- 非特許文献 17 : Johson K.L. et al. Environ Health Perspect 1997, 105(7):750-5
- 非特許文献 18 : Yang J.Z. and Foster W.G. Toxicol. Ind. Health 1997, 13(1):15-25
- 非特許文献 19 : Igarashi T. et al. Endocr. J. 1999, 46(6):765-72
- 非特許文献 20 : Pauwels A. et al. Hum. Reprod. 2001, 16(10):2050-5
- 非特許文献 21 : Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61(15):5707-9
- 非特許文献 22 : Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7
- 非特許文献 23 : Ohbayashi et al. FEBS Lett. 2001, 508(3):341-4

20

## 発明の開示

子宮内膜症の診断は、従来は、腹腔内視鏡による観血的な方法以外には有効な方法は存在しなかった。

25

一方、各種のヒト疾患に対して、その疾患に特異的なマーカータンパク質やその遺伝子発現を指標とする分子生物学的診断が普及しつつある。この方法は、大がかりな設備を必要とせず、被験者への負担も少ないため、自覚症状のない多くの被験者に対しても広範囲に実施することが可能である。しかしながら、子宮内膜症については、このような分子生物学的な診断方法を行うための有効なマーカータンパク質やその遺伝子は知られていない。

30

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、子宮内膜症に密接に関連する遺伝子発現を利用しい分子生物学的な診断方法を提供することを課題としている。

5

またこの出願の発明は、この診断方法に使用する各種材料を提供することを課題としている。

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(11)の発明を提供する。

10

(1) 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRF）ポリヌクレオチドの発現量を測定し、HRF ポリヌクレオチドの発現量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を示す被験者を、子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

15

(2) HRF ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする HRF オリゴヌクレオチド。

20

(3) 前記発明(2)の HRF オリゴヌクレオチドを標識化したオリゴヌクレオチドプローブ。

25

(4) 前記発明(2)の HRF オリゴヌクレオチドまたは HRF ポリヌクレオチドをターゲットキャプチャープローブとして備えた DNA マイクロアレイ。

(5) HRF ポリヌクレオチドを PCR 増幅するためのプライマーセット。

(6) 少なくとも以下の工程：

30

(a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；

- (b) 工程(a)で調製された RNA を電気泳動分離する工程；
- (c) 工程(b)で分離された RNA を前記発明(3)のオリゴヌクレオチドプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする工程；
- (d) 工程(e)で RNA にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブの標識量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

10

- (7) 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；
- (b) 工程(a)で調製した RNA から、標識 cDNA を調製する工程、
- (c) 工程(b)で調製した標識 cDNA を前記発明(4)の DNA マイクロアレイに接触させる工程；
- (d) 工程(c)で DNA マイクロアレイのキャプチャープローブにハイブリダイズした標識 cDNA の標識量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

15

20

- (8) 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；
- (b) 工程(a)で調製した RNA を鋳型とし、前記発明(5)のプライマーセットを用いて cDNA を合成する工程；
- (c) 工程(b)で合成された cDNA 量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (d) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、

25

30

を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

(9) 前記発明(6)、(7)および(8)の診断方法からなる群より選択される2以上の診断方法を含む子宮内膜症関連疾患の診断方法。

5

(10) 細胞内 HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子を含有することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療薬。

10 (11) 細胞内 HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子を体内に投与することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療方法。

すなわち、この出願の発明者らは、子宮内膜組織と子宮内膜症移植片における TCDD 標的遺伝子 (HRF、CYP1A1) の発現を調べた結果、子宮内膜症の進行と HRF 発現レベルに高い相関関係を見出してこの出願の発明を完成させた。

15

なおこの発明において、「子宮内膜症関連疾患」とは、子宮内膜症、および子宮内膜症を原因とする月経困難症、不妊症および子宮腺筋症等を意味する。「診断」とは、被験者が子宮内膜症関連疾患に罹患しているか否かの判定、将来的に子宮内膜症関連疾患に罹患する危険性が存在するか否かの判定、および治療後に子宮内膜症関連疾患を再発する危険性が存在するか否かの判定を意味する。また、  
20 診断には、子宮内膜症関連疾患の罹患やその危険性がどの程度であるか測定することとも含まれる。

また「HRF ポリヌクレオチド」とは HRF タンパク質をコードするポリヌクレ  
25 オチド [プリンまたはピリミジンが糖に  $\beta$ -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (ATP、GTP、CTP、UTP ; または dATP、dGTP、dCTP、dTTP) が結合した分子を意味する。具体的には、HRF タンパク質をコードするゲノム DNA、ゲノム DNA から転写される mRNA、mRNA から合成される cDNA である。また、2 本鎖であっても 1 本鎖であってもよい。さらに、これら  
30 のゲノム DNA や mRNA、cDNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖も含まれる。

また「ポリヌクレオチド」とは、前記のヌクレオチドが 100 個以上結合した分子を言い、「オリゴヌクレオチド」とは 2-99 個連結した分子を言う。さらに「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミド結合（ペプチド結合）によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から構成された分子を意味する。特にアミノ酸残基 2-33 個のものを「オリゴペプチド」、34 個以上のものを「ポリペプチド」と記載する。

また、配列表に示した塩基配列およびアミノ酸配列については、1 以上の塩基の付加、欠失、他の塩基への置換、あるいはこれらの塩基変異に基づく 1 以上のアミノ酸残基の付加、欠失および他のアミノ酸への置換をも包含する。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。なお、用語は基本的には IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature によるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 に、遺伝子工学および分子生物学的技術は J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 ; 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法 II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 III（組換え DNA 技術）」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology"; Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101

(Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in

- 5 Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 306, Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用され
- 10 た文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

15

#### 図面の簡単な説明

- 図 1 は、正常子宮内膜組織、子宮内膜症患者に由来する正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片における HRF と CYP1A1 の発現を調べた結果である。
- (A)HRF mRNA レベルはノーザンブロット分析により調べた。ブロットの再プロ
- 20 ープをヒト  $\beta$  アクチンプローブを用いて行い、トータル RNA レベルを決定した。ノーザンブロットにより調べた試料中の CYP1A1 mRNA レベルはサザンブロット分析を用いた定量的 RT-PCR により決定した。定量の精度を確認するため、5 倍の異なる濃度の cDNA 試料 (1x および 5x) を PCR テンプレートとして用い、同様な配置で調べた。 $\beta$  アクチンを mRNA 量に対する内部対照として用い
- 25 た。(B)HRF および CYP1A1 の mRNA レベルに対する画像表示を同様に示す。mRNA レベルは densitometry (MOLECULAR IMAGER, Nippon Bio-Rad) を用いて  $\beta$  アクチンシグナルに対して正規化した。試料 11-2A は HRF の mRNA レベル、10-2A は CYP1A1 の mRNA レベルを示し、任意に 10 に設定した。複数の試料が一個人由来である場合には、平均値を計算して表示した。エラ
- 30 ーバーは複数試料の最大値を表す。12-1、7-1、8-1 および 6B は正常な子宮内



膜組織であり、アスタリスクが印字された 1C は子宮内膜症患者の正所性子宮内膜である。

図 2 は、子宮内膜症移植片における HRF 発現を調べた結果である。(A)正常な  
5 子宮内膜組織、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片  
における HRF 発現のノーザンブロット分析の結果である。プロットはヒト  $\beta$  ア  
クチンプローブを用いて再プローブを行い、トータル RNA レベルを決定した。  
カラム上の N、Eu および En はそれぞれ正常な子宮内膜組織、子宮内膜症患者  
の正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片を示す。(B)図 1A および図 2A  
10 において調査した試料について、ノーザンブロット分析により測定した HRF  
mRNA レベルのグラフ表示である。HRF mRNA レベルは densitometry  
(MOLECULAR IMAGER, Nippon Bio-Rad) を用いて  $\beta$  アクチンシグナルに  
対して正規化した。試料 6B の mRNA レベルを任意に 1 に設定した。複数の試  
料が一個人由来である場合には、平均値を計算して表示した。エラーバーは複数  
15 試料の最大値を表す。

図 3 は、HRF および CD68 発現の免疫組織化学的分析の結果である。茶色の  
染色で陽性部分が可視化されている。逆染色にはヘマトキシリンを用いた。(A)  
および(B)正常な子宮内膜組織における HRF タンパク質の検出 (A:増殖フェーズ、  
20 B:分泌フェーズ、原図倍率  $\times 200$ )。(C)卵巣の子宮内膜症移植片内部における  
HRF タンパク質の検出 (原図倍率  $\times 200$ )。(D)子宮内膜症移植片の形態を示す  
連続切片の H&E 染色 (原図倍率  $\times 200$ )。(E)さらに高倍率で(C)と同じ視野の  
HRF タンパク質を検出したもの (原図倍率  $\times 400$ )。(F)子宮内膜症移植片の連  
続切片における CD68 陽性マクロファージの免疫組織化学的局在 (原図倍率  $\times$   
25 400)。

図 4 は、移植アッセイの結果である。(A)NIH3T3 細胞内の HRF タンパク質の  
ウェスタンブロット分析の結果。wt: 親の NIH3T3 細胞、HRF:HRF を含むレ  
トロウイルスベクターによる感染後に安定して HRF を発現する細胞株  
30 (pMSCV-HRF-3T3)、vector:空のベクターを感染させた対照細胞 (pMSCV-

3T3)。 (B)ヌードマウスにおける HRF 過剰発現細胞の示す高い移植効率を示す。縦軸上のマークは次の状態を示す。+++：無数の移植コロニーが観察された状態、++：数十個の移植コロニーが観察された状態、+：数個の移植コロニーが観察された状態、-：移植コロニーは観察されなかった状態。対照細胞または HRF 過剰  
5 発現細胞を注射した個々のマウスは、それぞれ白丸または黒丸により示す。

### 発明を実施するための最良の形態

10 この出願の発明(1)の診断方法は、被験者の生体試料における HRF ポリヌクレオチドの発現量を測定し、この HRF ポリヌクレオチドの発現量を指標として子宮内膜症関連疾患を診断する方法である。すなわち、HRF ポリヌクレオチドの発現量が正常生体試料と比較して有意に多い被験者を子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定する。HRF ポリヌクレオチドの発現量は子宮内  
15 膜症関連疾患と密接に関連することから、被験者の生体試料（例えば月経血等）におけるこの HRF ポリヌクレオチドの発現量を指標として子宮内膜症の診断を行うことができる。また HRF ポリヌクレオチド発現量が「有意に多い」とは、被験者のポリヌクレオチドの発現量が正常生体試料（すなわち健常者の生体試料）において測定された HRF ポリヌクレオチドと比較して、10%以上、好ましくは 30%以上、さらに好ましくは 70%以上、最も好ましくは 100%以上である  
20 場合を意味する。またさらに、この「有意に多い」とは、例えば同一被験者の複数試料についての HRF ポリヌクレオチド発現量の平均値と、複数の正常試料における同様の平均値とを統計的に検定した場合、前者が後者よりも有意に多い場合である。

25

HRF ポリヌクレオチドは、各種の変異体（例えば、GenBank/XM\_294045、XM\_038391、XM\_293291、XM\_209741、XM\_210566、XM\_066706、XM\_066675、XM\_071321 等）が知られているが、SEQ ID:1（塩基配列）に示した HRF cDNA（または TPT-1：GenBank/NM\_003295）を好ましいもの  
30 として例示する。このようなポリヌクレオチドは、それぞれ公知の方法によって

容易に取得することができる。例えば、cDNA の場合には、公知の方法 (Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982 ; J. Gene 25, 263-269, 1983 ; Gene, 150, 243-250, 1994) を用いて cDNA ライブラリーを合成し、それぞれ公知の塩基塩基配列に基づいて作製したプローブ DNA を用いて、それぞれの cDNA を単離  
5 する方法によって取得することができる。得られた cDNA は、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法および SDA (Strand Displacement Amplification) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。また、この発明によって提供されるプライマー  
10 セットを用い、ヒト細胞から単離した mRNA を鋳型とする RT-PCR 法によっても必要量の各 cDNA を得ることができる。

以上のとおりの HRF ポリヌクレオチド発現量を指標とする発明(1)の診断方法は、公知の遺伝子工学および分子生物学的技術に従い、当該分野で特定の遺伝子  
15 の発現を検知測定するために知られた手法、例えば in situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットイング、ドットプロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR、Real-Time PCR (Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193(2000)およびそこで引用されている文献)、DNA アレイ解析法 (Mark Shena 編、"Microarray Biochip Technology", Eaton Publishing, 2000 年 3 月) などによって HRF ポリヌクレオチド発現量を検知・測定して実  
20 施することができる。こうした技術を利用した HRF ポリヌクレオチド発現測定系、子宮内膜症関連疾患の検出系、子宮内膜症関連疾患のリスク検出系、それに利用する試薬、方法、プロセス、解析プログラムなどは、すべてこの発明の技術およびそれに利用するシステムに含まれる。

25

この出願は、前記の発明(1)の診断方法に使用する材料として、特に以下の発明(2)～(5)を提供する。

発明(2)の HRF オリゴヌクレオチドは、HRF ポリヌクレオチドとストリンジ  
30 エント (stringent) な条件下でハイブリダイゼーションすることを特徴とする。

この HRF オリゴヌクレオチドは、例えば前記の HRF ポリヌクレオチド (cDNA) を適当な制限酵素で切断することによっても得ることができる。あるいは、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第 4,458,066 号に記載されているような周知の化学合成技術により、*in vitro* において合成することができる。

またストリンジェントな条件とは、前記のポリヌクレオチドとオリゴヌクレオチドとの選択的かつ検出可能な特異的結合を可能とする条件である。ストリンジェント条件は、塩濃度、有機溶媒（例えば、ホルムアミド）、温度、およびその他公知の条件によって定義される。すなわち、塩濃度を減じるか、有機溶媒濃度を増加させるか、またはハイブリダイゼーション温度を上昇させるかによってストリンジェンシー (stringency) は増加する。例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、NaCl 約 750 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 75 mM 以下、より好ましくは NaCl 約 500 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 50 mM 以下、最も好ましくは NaCl 約 250 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 25 mM 以下である。ストリンジェントな有機溶媒濃度は、ホルムアミド約 35% 以上、最も好ましくは約 50% 以上である。ストリンジェントな温度条件は、約 30℃ 以上、より好ましくは約 37℃ 以上、最も好ましくは約 42℃ 以上である。その他の条件としては、ハイブリダイゼーション時間、洗浄剤（例えば、SDS）の濃度、およびキャリアー DNA の存否等であり、これらの条件を組み合わせることによって、様々なストリンジェンシーを設定することができる。1つの好まし態様としては、750 mM NaCl、75 mM クエン酸三ナトリウムおよび 1% SDS の条件で、30℃ の温度によりハイブリダイゼーションを行う。より好ましい態様としては、500 mM NaCl、50 mM クエン酸三ナトリウム、1% SDS、35% ホルムアミド、100  $\mu$ g/ml の変性サケ精子 DNA の条件で、37℃

の温度によりハイブリダイゼーションを行う。最も好ましい態様としては、250 mM NaCl、25 mM クエン酸三ナトリウム、1% SDS、50%ホルムアミド、200  $\mu$ g/ml の変性サケ精子 DNA の条件で、42℃の温度によりハイブリダイゼーションを行う。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄の条件もストリンジェンシーに影響する。この洗浄条件もまた、塩濃度と温度によって定義され、塩濃度の減少と温度の上昇によって洗浄のストリンジェンシーは増加する。例えば、洗浄のためのストリンジェントな塩条件は、好ましくは NaCl 約 30 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 3 mM 以下、最も好ましくは NaCl 約 15 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 1.5 mM 以下である。洗浄のためのストリンジェントな温度条件は、約 25℃以上、より好ましくは約 42℃以上、最も好ましくは約 68℃以上である。1つの好ましい態様としては、30 mM NaCl、3 mM クエン酸三ナトリウムおよび 0.1% SDS の条件で、25℃の温度により洗浄を行う。より好ましい態様としては、15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウムおよび 0.1% SDS の条件で、42℃の温度により洗浄を行う。最も好ましい態様としては、15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウムおよび 0.1% SDS の条件で、68℃の温度により洗浄を行うことである。

発明(3)は、前記の HRF オリゴヌクレオチドを標識化したオリゴヌクレオチドプローブである。標識は、ラジオアイソトープ (RI) 法または非 RI 法によって行うことができるが、非 RI 法を用いることが好ましい。非 RI 法としては、蛍光標識法、ビオチン標識法、化学発光法等が挙げられるが、蛍光標識法を用いることが好ましい。蛍光物質としては、オリゴヌクレオチドの塩基部分と結合できるものを適宜に選択して用いることができるが、シアニン色素 (例えば、Cy Dye™ シリーズの Cy3、Cy5 等)、ローダミン 6G 試薬、N-アセトキシ-N<sup>2</sup>-アセチルアミノフルオレン (AAF)、AAIF (AAF のヨウ素誘導体) などを使用することができる。また標識法としては、当該分野で知られた方法 (例えばランダムプライム法、ニック・トランスレーション法、PCR による DNA の増幅、ラベリング/テイリング法、in vitro transcription 法等) を適宜選択して使用できる。例えば、HRF オリゴヌクレオチドに官能基 (例えば、第一級脂肪族アミノ基、SH 基など) を導入し、こうした官能基に前記の標識を結合して標識化オリ

ゴヌクレオチドプローブを作成することができる。

発明(4)は、前記発明(2)の HRF オリゴヌクレオチドまたは HRF ポリヌクレオチドをターゲットキャプチャプローブとして備えた DNA マイクロアレイである。

マイクロアレイの作製方法としては、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを固相担体表面に固定する方法とが知られている。この発明で使用するマイクロアレイは、このいずれの方法でも作製することができる。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微少なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（マスキング技術：例えば、Fodor, S.P.A. Science 251:767, 1991）等によって行うことができる。

一方、予め調製したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを固相担体表面に固定する場合には、官能基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面にオリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一般的には、表面処理した固相担体にスパーサーやクロスリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこに合成オリゴヌクレオチドを共有結合させる方法も知られている（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996）。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化オリゴヌクレオチドを固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知られている（Sosnowski, R.G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1119-1123, 1997）。このマイクロアレイを使用して血管炎を診断する場合には、例えば被験者の細胞から単離した mRNA を鋳型として、cDNA を合成し、PCR 増幅する。

その際に、標識 dNTP を取り込ませて標識 cDNA とする。この標識 cDNA をマ  
クロアレイに接触させ、マイクロアレイのキャプチャープローブ（オリゴヌクレ  
オチドまたはポリヌクレオチド）にハイブリダイズした cDNA を検出する。ハ  
イブリダイゼーションは、96 穴もしくは 384 穴プラスチックプレートに分注し  
5 て標識 cDNA 水性液を、マイクロアレイ上に点着することによって実施するこ  
とができる。点着の量は、1~100nl 程度とすることができる。ハイブリダイゼ  
ーションは、室温~70℃の温度範囲で、6~20 時間の範囲で実施することが好  
ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用  
いて洗浄を行い、未反応の標識 cDNA を除去する。界面活性剤としては、ドデ  
10 シル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエ  
ン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用  
いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

発明(5)は、HRF ポリヌクレオチドを PCR 増幅するためのプライマーセット  
15 である。このプライマーセットは公知の塩基塩基配列に基づき設計し、合成・精  
製の各工程を経て調製することができる。なお、プライマー設計の留意点として、  
例えば以下を挙げることができる。プライマーのサイズ（塩基数）は、鋳型  
DNA との間の特異的なアニーリングを満足させることを考慮し、15-40 塩基、  
望ましくは 15-30 塩基である。ただし、LA (long accurate) PCR を行う場合  
20 には、少なくとも 30 塩基が効果的である。センス鎖（5'末端側）とアンチセン  
ス鎖（3'末端側）からなる 1 組あるいは 1 対（2 本）のプライマーが互いにアニ  
ールしないよう、両プライマー間の相補的配列を避けると共に、プライマー内の  
ヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。さらに、  
鋳型 DNA との安定な結合を確保するため GC 含量を約 50%にし、プライマー  
25 内において GC-rich あるいは AT-rich が偏在しないようにする。アニーリング  
温度は  $T_m$  (melting temperature) に依存するので、特異性の高い PCR 産物  
を得るため、 $T_m$  値が 55-65℃で互いに近似したプライマーを選定する。また、  
PCR におけるプライマー使用の最終濃度が約 0.1~約 1  $\mu$ M になるよう調整す  
る等を留意することも必要である。また、プライマー設計用の市販のソフトウェ  
30 ア、例えば OligoTM [National Bioscience Inc. (米国) 製]、GENETYX [ソ

フトウェア開発（株）（日本）製]等を用いることもできる。

5 以上のとおりの材料（発明(2)～(5)）を使用することによって、様々な形態の子宮内膜症関連疾患のそのリスクを診断するための試薬セットの作成や診断方法の構築が可能となる。特にこの出願では、子宮内膜症関連疾患およびそのリスクの診断方法として、以下の発明(6)～(9)が提供される。

- すなわち発明(6)の診断方法は、発明(3)のオリゴヌクレオチドプローブを用いて HRF ポリヌクレオチドの発現量（mRNA 量）を検出する方法（ノーザンブロット分析法）である。この診断方法は、少なくとも以下の工程：
- (a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；
  - (b) 工程(a)で調製された RNA を電気泳動分離する工程；
  - (c) 工程(b)で分離された RNA を前記発明(3)のオリゴヌクレオチドプローブとストリンジントな条件下でハイブリダイズする工程；
  - 15 (d) 工程(e)で RNA にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブの標識量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
  - (e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
  - 20 を含むことを特徴とする。

また発明(7)の診断方法は、発明(4)の DNA マイクロアレイを使用する方法である。この方法は、少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；
- 25 (b) 工程(a)で調製した RNA から、標識 cDNA を調製する工程、
- (c) 工程(b)で調製した標識 cDNA を前記発明(4)の DNA マイクロアレイに接触させる工程；
- (d) 工程(c)で DNA マイクロアレイのキャプチャープローブにハイブリダイズした標識 cDNA の標識量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生
- 30 体試料の結果と比較する工程；および



(e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする。

- 5 さらに発明(8)の診断方法は、発明(5)のプライマーセットを用いて、HRF ポリヌクレオチド（具体的には mRNA）の発現量を測定する方法（RT-PCT 法）である。この方法は、少なくとも以下の工程：
- (a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；
- (b) 工程(a)で調製した RNA を鋳型とし、前記発明(5)のプライマーセットを用いて cDNA を合成する工程；
- 10 (c) 工程(b)で合成された cDNA 量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (d) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
- 15 を含むことを特徴とする。

またさらに、発明(9)の診断方法は、前記発明(6)、(7)および(8)の診断方法からなる群より選択される 2 以上の診断方法を含む方法である。

- 20 またこの出願によって提供される診断方法は、例えば HRF ポリヌクレオチドがコードする HRF タンパク質を特異的に認識する抗体等を用いて HRF タンパク質の存在量を測定することによって子宮内膜症関連疾患を診断する方法と組み合わせることもできる。

- 25 なお、以上の各診断方法において、標識の観察や標識量の測定には、標識の種類に応じて当該分野で知られた方法を適宜選択して使用でき、例えば暗視野顕微鏡、位相差顕微鏡、反射コントラスト顕微鏡、蛍光顕微鏡、デジタルイメージング顕微鏡、電子顕微鏡などによる方法も使用することができる。

- 30 以上の診断方法は、子宮内膜症関連疾患の診断、予防、治療において有用であ

る。さらには、子宮内膜症関連疾患を治療した後、即ち、予後の状態を知る上でも有用である。

発明(10)は、細胞内 HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子を含有する  
5 ことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療薬であり、また発明(11)は、細胞内  
HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子を体内に投与することを特徴とす  
る子宮内膜症関連疾患の治療方法である。すなわち、後記実施例にも示したよう  
に、HRF ポリヌクレオチドを過剰に発現する細胞は *in vivo* において活発に増  
殖することから、細胞内 HRF ポリヌクレオチドの過剰発現が子宮内膜組織の移  
10 植や増殖の原因となっていると考えられる。そこでこの HRF ポリヌクレオチド  
の発現を抑制することによって、子宮内膜症関連疾患の治療、または少なくとも  
その進行、悪化を停止もしくは抑制することが可能となる。

細胞内 HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子としては、アンチセンス  
15 配列、リボザイム、キメラオリゴ、RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) を生  
じさせる二本鎖 RNA 分子等 (以下、これらは「発現抑制分子」と記載することが  
ある) を使用することができる。特に、RNAi は外来性 RNA 分子によって標  
的遺伝子の mRNA を分解し、標的遺伝子の発現を抑制する手法であり、アンチ  
センス配列等と比較して、標的遺伝子の発現抑制効果が格段に優れているために、  
20 好ましい手段である。使用する RNA 分子としては、二本鎖 RNA (double-  
strand RNA: dsRNA)、より好ましくはその短鎖 (20-25bp 程度) の RNA (  
small interfering RNA: siRNA) (例えば、Elbashir S.M. et al. Genes Dev.  
2001, 15(2):188-200)、ヘアピン構造の短鎖 RNA (short hairpin RNA:  
shRNA) (例えば、Paddison P.J. et al. Genes Dev. 2002, 16(8):948-958)、  
25 および siRNA とは別の短鎖 RNA (small temporally regulated RNA: stRNA)  
(例えば、Grosshans H. and Slack F.J. J. Cell Biol. 2002, 156(1):17-21)  
等が好ましい。

以上のとおりの発現抑制分子は、標的遺伝子 (HRF ポリヌクレオチド) の配  
30 列 (例えば配列番号 1) に基づき設計され、公知の化学合成または *in vitro* 転

写翻訳等の手段で作成することができる。なお、例えば siRNA の設計に当たっては、以下を留意することが提案されている。(1)調節タンパク質結合部位の多い 5'および 3'の非翻訳領域 (UTR) と開始コドン周辺領域は除外する；(2)開始コドンの 50 から 100 ヌクレオチド下流の領域を選択する；(3)選択した領域から AA(N19)TT または AA(21)となる領域であって、GC 含量が少なくとも 30% から 70%、好ましくは 50% 程度の領域を選択する。

作成された発現抑制分子は、適当な溶媒と混合した状態で体内に投与することができるが、その効果をより持続させるためには、発現ベクターの形態で投与することが好ましい。発現ベクターとしては、プラスミドベクターまたはウイルスベクター等を使用することができる。例えば、RNAi 用の RNA 分子を発現させる場合のプラスミドベクターとしては、市販の piGENE シリーズ、pSINsi/pBAsi シリーズ等を使用することができる。また、ウイルスベクターとしては、複製欠損性か、条件により複製するか、または複製コンピテントとなるべくさらに加工されたアデノウイルス（例えば、ヒトアデノウイルスゲノムに由来する複製非コンピテントベクター、例えば米国特許第 6,096,718 号；6,110,458 号；6,113,913 号；5,631,236 号参照）、アデノ随伴ウイルスおよびレトロウイルスゲノムに由来するベクター等を使用することができる。レトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、およびそれらの組合せを主成分とするものが含まれる（例えば、米国特許第 6,117,681 号；6,107,478 号；5,658,775 号；5,449,614 号；Buchscher (1992) J. Virol. 66:2731-2739; Johann (1992) J. Virol. 66:1635-1640 参照）。このようなウイルスベクターは、例えば siRNA 発現用のアデノウイルスベクターの場合、まず、基本プラスミドベクター（例えば pBAsi）を構築し、この基本ベクターからプロモーター+siRNA コード配列を切り出し、これをアデノウイルスベクター作成用コスミドに載せ換え、この組換えコスミドを 293 細胞等にトランスフェクションすることによって作成することができる。

30 以上のとおりの発現ベクターは、通常の遺伝子治療等の手順に従って、患者の

子宮内膜等を含め、あらゆる投与経路によっても体内に投与することができる。  
また、プラスミドベクターの場合には、Hydrodynamic 法 (Song E. et al.  
Nature Medicine 2003, 9(3):347-351) によって静脈内に投与することも好ましい方法である。

5

## 実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

### 1. 材料と方法

#### 1-1. 組織試料

RNA 調製のために、18 例の患者から以下の試料を得た。1)子宮内膜症移植片 (n=21)、2)子宮内膜症患者に由来する正所性子宮内膜組織 (搔爬による; n=4)、3) 子宮内膜症を持たない患者に由来する正常子宮内膜組織 (n=6)。いくつかの試料は一個人の異なる部位から得た。試料は液体窒素中で凍結し、-80℃で貯蔵して RNA 調製に備えた。子宮内膜症移植片は卵巣から得た。RNA 調製用の正常子宮内膜組織と、正常に増殖および分泌を行う子宮内膜組織をホルマリン固定、パラフィン包埋した試料は、平滑筋腫または子宮脱の患者から取得した。病理標本は組織学的試験により段階づけを行った結果、それらは子宮内膜症の第 III から IV 段階にわたっていた (t-ASRM: revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis [改訂版米国生殖医学学会子宮内膜症分類]、1996)。また、この研究の女性被験者は子宮内膜の過形成や腫瘍形成を示さず、手術前に抗炎症剤やホルモン剤の投与を受けていなかった。手術前に書面の同意を得たが、これは東京医科大学病院の人体調査に関する施設内監査委員会により承認されたプロトコルに従った。

#### 1-2. ノーザンブロット分析

30

ノーザンブロットは文献 (Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61(15):5707-9) の記載により実施した。HRF プローブは文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) の記載に従って調製した。ヒト  $\beta$  アクチン cDNA 対照プローブ (CLONTECH Laboratories, Inc.) をスタンダードとした。

#### 1-3. サザンブロット分析を用いた RT-PCR

文献 (Kubota M. et al. Am. J. Pathol. 1997, 151(3):735-44) の記載に従い、オリゴヌクレオチド dT プライマーを用いてトータル RNA から第 1 鎖 cDNA を合成した。次に、得られた第 1 鎖 cDNA 溶液  $2\mu\text{l}$  (1x) および  $10\mu\text{l}$  (5x) をテンプレートとして用い、PCR を行った。以下の 4 種類のプライマーを添加した後、初期変性を  $95^{\circ}\text{C}$  で 2 分間、( $95^{\circ}\text{C}$  で 0.5 分、 $65^{\circ}\text{C}$  で 0.5 分、 $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分)  $\times 22$  サイクルの条件で CYP1A1 と  $\beta$  アクチンの cDNA 断片の PCR 増幅した。

15

CYP1A1 増幅用プライマー : 5'-ccacaaccaccaagaactgcttag-3' (SEQ ID: 3)

5'-gaaggggacgaaggaagagtg-3' (SEQ ID: 4)

$\beta$  アクチン増幅用プライマー : 5'-gggaaatcgtgcgtgacgttaag-3' (SEQ ID: 5)

5'-tgtgttggtgcgtacaggtctttg-3' (SEQ ID: 6)

20

増幅産物をアガロースゲル上の電気泳動により分画した後、プロットティングとハイブリダイゼーションを行った。CYP1A1 cDNA プローブは、上述のプライマー対を用いた逆転写 PCR により得た。ヒト  $\beta$  アクチン cDNA プローブ (CLONTECH) を対照として用いた。Rediprime II random prime labeling system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、これらの cDNA プローブを  $^{32}\text{P}$  により標識した。

25

#### 1-4. 抗体調製と免疫組織化学法

ヒト HRF に由来するオリゴペプチド (GKLEEQRPERVKPFMT : SEQ ID: 2 の 101-116) に対するペプチド抗体を、ウサギを用いた標準法により行った作

30

製し、HRF-GKL と命名した。免疫組織化学的分析は、脱パラフィン化した切片を抗 HRF 抗体、HRF-TPY (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) および HRF-GKL (1:100 に希釈) または抗ヒト CD68 抗体 (1:100 に希釈; Dako 社) の混合液の存在下で一夜インキュベートした。抗 HRF 染色用には、脱パラフィン化した切片を圧力滅菌器を用いて熱誘導性の抗原回復に供した。LSABC (Dako) を用いて検出を行ったが、ここでは 3,3'-ジアミノベンチジンを色素体として使用した。ヘマトキシリンを用いて逆染色を行った。

#### 10 1-5.ウエスタンブロット分析

ウエスタンブロット分析は文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) の記載に従って行った。膜のプローブ処理は抗 HRF (HRF-GKL または HRF-TPY) 抗体を用い、1:2000 の希釈比で行った。シグナル検出は ECL plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行った。

#### 1-6. 細胞培養とレトロウイルス感染

NIH3T3 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より取得した。細胞は、37℃ 条件で 10% FBS を添加した DMEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) 中、5% CO<sub>2</sub> 環境下に維持した。全長 ORF を含むマウス HRF cDNA を以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。

5'-ttggatccatgatcatctaccgggacctg-3' (SEQ ID: 7)

5'-ttgaattcttaacatttctccatctctaa-3' (SEQ ID: 8)

得られた cDNA 断片を BamHI および EcoRI で消化し、レトロウイルス発現ベクター MSCV-puro (CLONTECH) の BglII-EcoRI 部位にクローニングした。組み替えレトロウイルスの調製と感染のプロトコルは文献 (Kuroda > et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(9):5025-30) の記載に従った。感染の 24 時間後、1 μg/ml ピューロマイシン (CLONTECH) を用いて 2 週間にわたり感染細胞を選別した。

## 1-7. 動物と処置

5×10<sup>5</sup>個の細胞の部分標本を、6週齢のメス BALB/C ノードマウスの腹腔内に注射して移植アッセイを行った。2週間後に動物を屠殺し、移植片コロニー数を測定した。

5

## 2. 結果

### 2-1. 子宮内膜症における TCDD 誘導性遺伝子 HRF の発現パターン

ノーザンブロット分析により、子宮内膜症時の HRF 発現パターンを決定した。その結果、5例中3例の患者から得た子宮内膜症移植片組織中に高レベルの HRF 発現が認められた（図1Aおよび1B）。ヒトのチトクローム p450 遺伝子スーパーファミリーの一部（例えば CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1）はジオキシンにより誘導されるため、CYP1A1 の誘導はジオキシン依存性の遺伝子発現調節に対する基本的な標的になる。このためジオキシン曝露と HRF 発現の関連を調べるために、ここではサザン分析による RT-PCR を用いて CYP1A1 発現を調査した（Trifa Y. et al. J. Biol. Chem. 1998, 273(7):3980-5; Oikawa K. et al. Gene 2000, 261(2):221-8）。その結果、CYP1A1 は必ずしも高 HRF 発現を示す全例において誘導されている訳ではなかった（図1Aおよび1B）。このため、いくつかのケースでは HRF 発現が TCDD により誘導されている可能性はあるにも関わらず、子宮内膜症移植片における HRF は TCDD 曝露とは無関係に誘導されていることが確認された。

10  
15  
20

### 2-2. 子宮内膜症移植片における HRF 過剰発現

子宮内膜症を追加発症した患者の子宮内膜症移植片において、HRF が過剰発現していることが確認された。すなわち、7例の子宮内膜症患者について、ノーザンブロット分析を行った（図2A）。正常な子宮内膜組織および子宮内膜症患者の正所性の子宮内膜と比較すると、子宮内膜症移植片においては高度な HRF 発現が観察された（図2B）。

25

### 2-3. 正常子宮内膜と子宮内膜症移植片における HRF の免疫組織化学

HRF を発現する子宮内膜細胞のタイプを、抗 HRF ポリクローナル抗体を用い

30

た免疫組織化学により決定した。その結果、HRF が子宮内膜腺と正常組織の間質細胞に共に存在することが同定されたが、宮内膜腺は間質細胞より強い発現を示した（図 3A および 3B）。分泌と増殖フェーズの間における発現パターンの顕著な変化はなかった。さらに、子宮内膜症移植片における HRF 発現も調査した。その結果、卵巣の子宮内膜症移植片の間質および上皮成分の両方に HRF が存在していた（図 3C と 3E）。正常な子宮内膜の間質細胞での HRF 発現は弱いものに対して、卵巣の子宮内膜症移植片では子宮内膜腺と間質細胞はいずれも同様な高レベルの HRF 発現を示した。これらの HRF に対する特異的なシグナルは、免疫前血清を対照として用いた場合には観察されなかった（データ示さず）。しかしながら、子宮内膜症移植片における HRF 誘導のメカニズムは依然として不明である。M-CSF による活性化段階においてマクロファージが HRF を誘導することを示す報告（Teshima S. et al. J. Immunol. 1998, 161(11):6353-66）と一致するように、子宮内膜症移植片においては CD68 陽性のマクロファージの関与が観察されている（Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6):1949-54）。従って、移植片の連続切片に対する CD68 染色を利用して、HRF 過剰発現領域内部における CD68 陽性のマクロファージを同定した（図 3F）。ヘマトキシリン-エオジンを用いて染色した対照切片は、子宮内膜症移植片の全体的な形態を示している。これらの結果から、子宮内膜症移植片における HRF 産生にはマクロファージが寄与しているであろうと考えられる。

20

#### 2-4. NIH3T3 細胞の腹腔内移植に対する HRF の効果

HRF 発現増加による生理学的な影響について調査した。子宮内膜症の原因は未だに不明である（Klinckx R.P. et al. Gynecol Obstet Invest. 1999, 47 Suppl 1:3-9, discussion 9-10; van der Linden P.J.Q. Front Biosci. 1997, 2:c48-52）。主要な仮説に従うならば、子宮内膜症の発症は、卵管逆流により腹腔に達した（逆行性月経）子宮内膜組織の移植および増殖による。ここではこの移植に対して HRF が及ぼす影響を調査した。最初に、HRF を過剰発現する NIH3T3 細胞の安定形質移入体を作製した。HRF 発現用のレトロウイルスベクター（pMSCV-HRF）を感染後に、高度な HRF 発現が確認された（図 4A）。次にこれらの細胞（pMSCV-HRF-3T3 細胞）をヌードマウスの腹腔内に注射し

30



た。pMSCV-HRF-3T3 細胞は、対照ベクター（pMSC-3T3）を感染させた細胞と比較して高い移植能を有していた（図 4B）。これらのデータから、HRF は免疫学的機能不全においてのみならず、子宮内膜症移植片の初期発達にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

5

#### 産業上の利用可能性

10 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、子宮内膜症関連疾患およびそのリスクを簡便かつ確実に診断する方法と、そのための材料が提供される。これによって、子宮内膜症関連疾患の早期の発見、より適切な治療法の選択、再発の防止等が可能となる。

15

## 請求の範囲

1. 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRF）ポリヌクレオチドの発現量を測定し、HRF ポリヌクレオチドの発現量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を示す被験者を、子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度の指標とすることを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。
2. HRF ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする HRF オリゴヌクレオチド。
3. 請求項 2 の HRF オリゴヌクレオチドを標識化したオリゴヌクレオチドプローブ。
4. 請求項 2 の HRF オリゴヌクレオチドまたは HRF ポリヌクレオチドをターゲットキャプチャープローブとして備えた DNA マイクロアレイ。
5. HRF ポリヌクレオチドを PCR 増幅するためのプライマーセット。
6. 少なくとも以下の工程：
  - (a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；
  - (b) 工程(a)で調製された RNA を電気泳動分離する工程；
  - (c) 工程(b)で分離された RNA を請求項 3 のオリゴヌクレオチドプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする工程；
  - (d) 工程(c)で RNA にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブの標識量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
  - (e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、

を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

7. 少なくとも以下の工程：

(a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；

5 (b) 工程(a)で調製した RNA から、標識 cDNA を調製する工程、

(c) 工程(b)で調製した標識 cDNA を請求項 4 の DNA マイクロアレイに接触させる工程；

(d) 工程(c)で DNA マイクロアレイのキャプチャープローブにハイブリダイズした標識 cDNA の標識量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常生  
10 体試料の結果と比較する工程；および

(e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮  
内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、  
を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

15 8. 少なくとも以下の工程：

(a) 被験者の生体試料より RNA を調製する工程；

(b) 工程(a)で調製した RNA を鋳型とし、請求項 5 のプライマーセットを用いて  
cDNA を合成する工程；

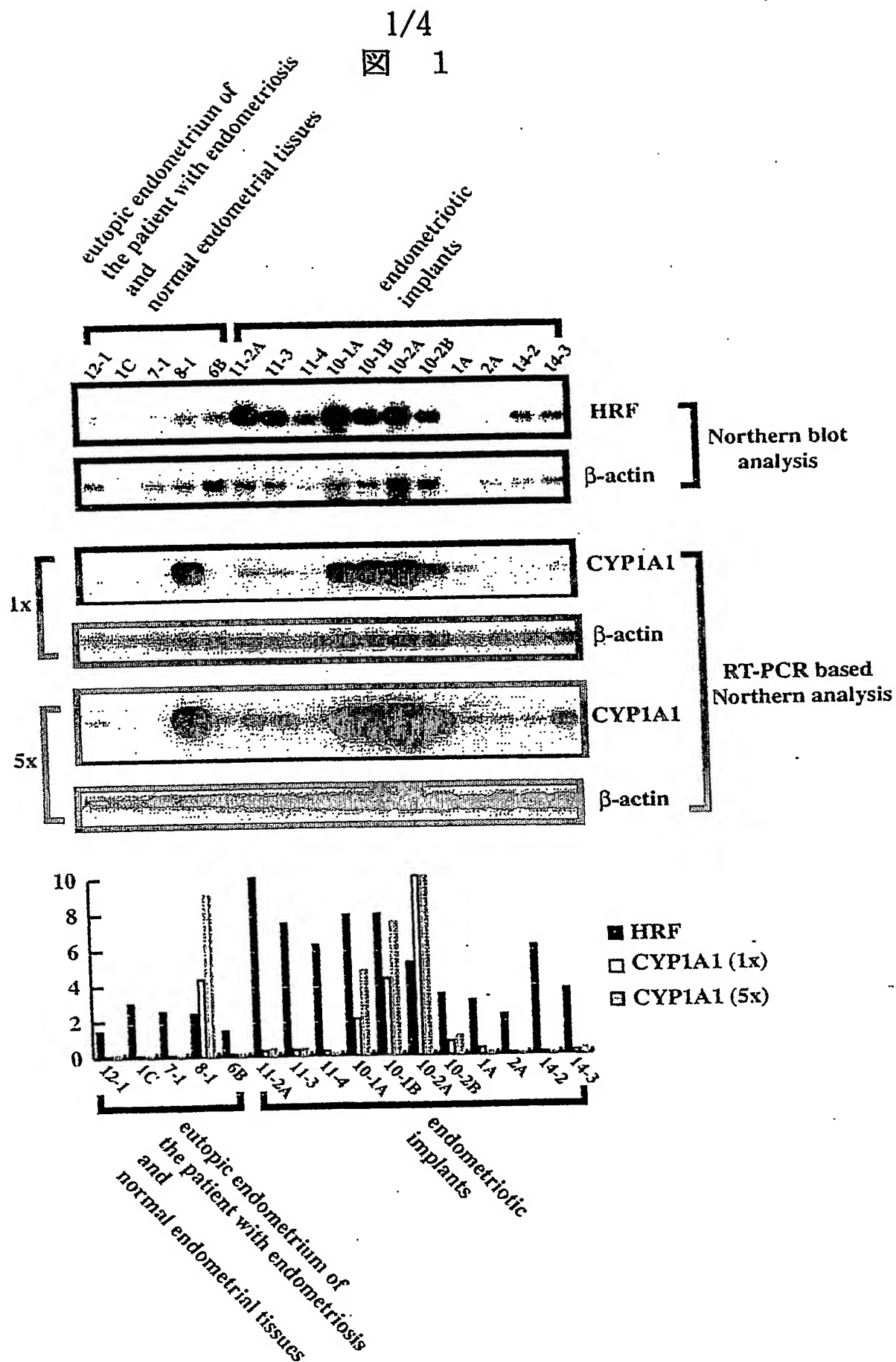
(c) 工程(b)で合成された cDNA 量を HRF ポリヌクレオチド発現量の指標とし、  
20 正常生体試料の結果と比較する工程；および


(d) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF ポリヌクレオチド発現量を、子宮  
内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、  
を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

25 9. 請求項 6、7 および 8 の診断方法からなる群より選択される 2 以上の診断  
方法を含む子宮内膜症関連疾患の診断方法。

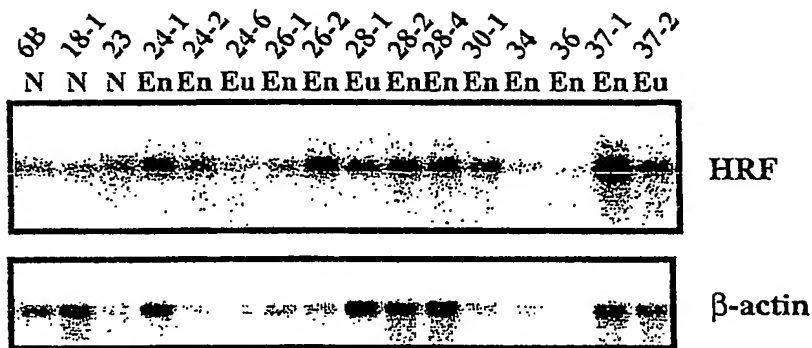
10. 細胞内 HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子を含有することを特  
徴とする子宮内膜症関連疾患の治療薬。

11. 細胞内 HRF ポリヌクレオチドの発現を抑制する分子を体内に投与することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療方法。

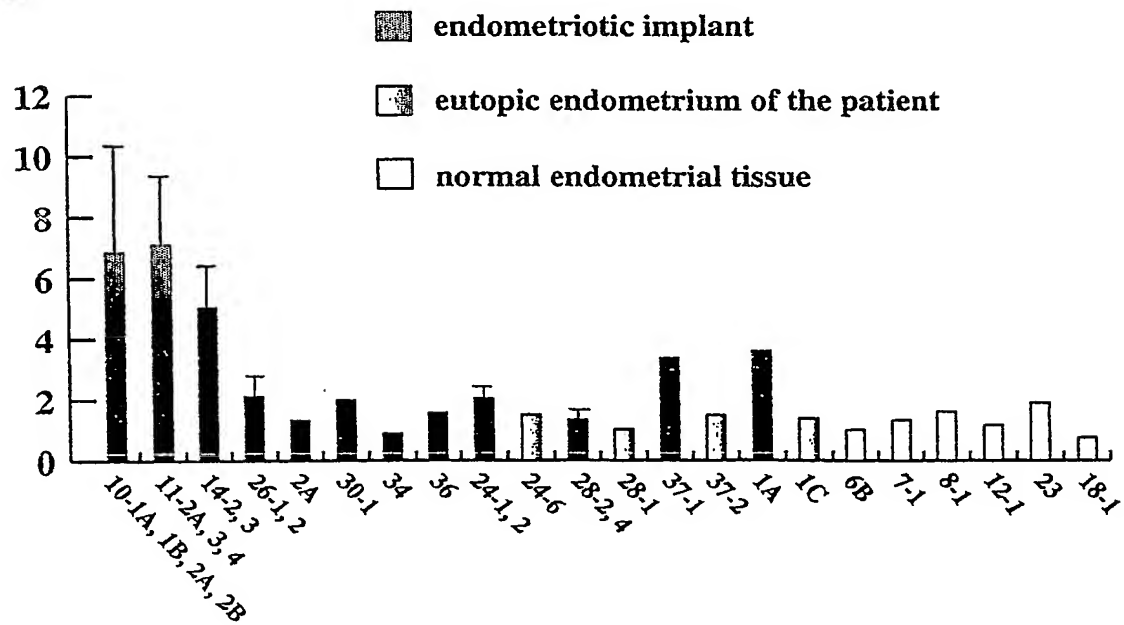


2/4  
 2

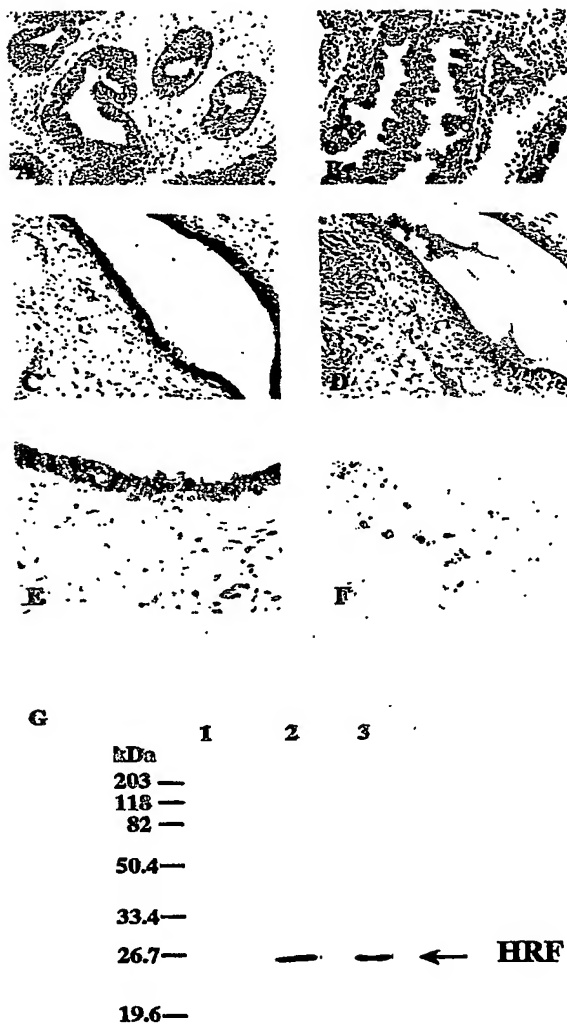
A




B

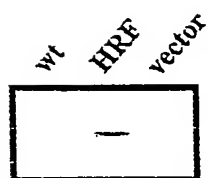


3/4  
図 3

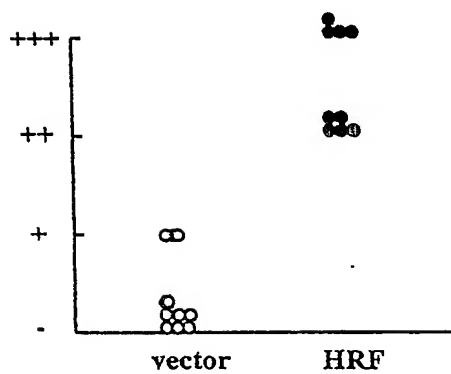


4/4  
 4

**A**



**B**





1/5

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; Diagnosis method of endometriosis

&lt;130&gt; 03-F-103PCT

&lt;150&gt; JP2003-196455

&lt;151&gt; 2003-07-14

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 830

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (95).. (613)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

```

cccccccgag cgccgctccg gctgcaccgc gctcgctccg agtttcaggc tcgtgctaag      60
ctagcgccgt cgctgtctcc cttcagtcgc catc atg att atc tac cgg gac etc      115
                               Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu
                               1               5

atc agc cac gat gag atg ttc tcc gac atc tac aag atc cgg gag atc      163
Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile
      10               15               20

gcg gac ggg ttg tgc ctg gag gtg gag ggg aag atg gtc agt agg aca      211
Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu Gly Lys Met Val Ser Arg Thr
      25               30               35

gaa ggt aac att gat gac tcg ctc att ggt gga aat gcc tcc gct gaa      259
Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu
40               45               50               55

```

2/5

ggc ccc gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta atc act ggt gtc gat 307  
 Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser Thr Val Ile Thr Gly Val Asp  
                     60                    65                    70

att gtc atg aac cat cac ctg cag gaa aca agt ttc aca aaa gaa gcc 355  
 Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala  
                     75                    80                    85

tac aag aag tac atc aaa gat tac atg aaa tca atc aaa ggg aaa ctt 403  
 Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu  
                     90                    95                    100

gaa gaa cag aga cca gaa aga gta aaa cct ttt atg aca ggg gct gca 451  
 Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala  
                     105                    110                    115

gaa caa atc aag cac atc ctt gct aat ttc aaa aac tac cag ttc ttt 499  
 Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe  
                     120                    125                    130                    135

att ggt gaa aac atg aat cca gat ggc atg gtt gct cta ttg gac tac 547  
 Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr  
                     140                    145                    150

cgt gag gat ggt gtg acc cca tat atg att ttc ttt aag gat ggt tta 595  
 Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu  
                     155                    160                    165

gaa atg gaa aaa tgt taa caaatgtggc aattattttg gatctatcac 643  
 Glu Met Glu Lys Cys  
                     170

ctgtcatcat aactggcttc tgcttgtcat ccacacaaca ccaggactta agacaaatgg 703

gactgatgtc atcttgagct cttcatttat tttagctgtg atttatttgg agtggaggca 763

ttgtttttaa gaaaaacaig tcatgtaggt tgtctaaaaa taaaatgcat ttaaactcat 823

ttgagag 830

<210> 2  
 <211> 172  
 <212> PRT

3/5

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp
1           5           10           15
Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
20           25           30
Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
35           40           45
Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
50           55           60
Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
65           70           75           80
Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
85           90           95
Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys
100          105          110
Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
115          120          125
Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
130          135          140
Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
145          150          155          160
Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
165          170

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 3

ccacaaccac caagaactgc ttag

24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

4/5

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 4

gaaggggacg aaggaagagt g

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 5

gggaaatcgt gcgtgacgtt aag

23

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 6

tgtgttggcg tacaggtctt tg

22

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 7

ttggatccat gatcatctac cgggacctg

29

5/5

<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8  
ttgaattcctt aacatttctc catctctaa

29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000159

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ON-LINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-503461 A (Reprogen, Inc.), 28 January, 2003 (28.01.03), & WO 01/01998 A & AU 200058376 A & EP 1191942 A & US 6544740 B	1, 6-9
A	Nobuhiro SUZUMORI, Expression of secretory leukocyte protease inhibitor in women with endometriosis, FERTILITY AND STERILITY, Vol.72, No.5, pages 857 to 867, 1999	1, 6-9
X	WO 94/12881 A (HOCHSTRASSER), 09 June, 1994. (09.06.94), & AU 9456946 A	2-4
X	WO 02/22170 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 21 March, 2002 (21.03.02),	2-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 February, 2004 (06.02.04)

Date of mailing of the international search report

24 February, 2004 (24.02.04)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000159

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000159

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention according to the above claim pertains to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☒ Claims Nos.: 10, 11

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Although the inventions according to claims 10 and 11 each involves "a molecule inhibiting the expression of an HRF polynucleotide in cells", it is unclear what molecules are involved in the scope of the above-described molecule.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 and 6 to 9 (invention group 1) relate to methods of examining a disease relating to endometriosis by measuring the expression dose of a histamine-release factor, claims 2 to 4 (invention group 2) relate to an HRF oligonucleotide and use thereof, and claims 10 and 11 (invention group 3) relate to a remedy and a therapeutic method.

As stated in WO 94/12881 A and WO 02/22170 A, the HRF polynucleotide had been known and thus the HRF polynucleotide cannot be considered as "a special technical feature". No common matter is observed between the principle of the examination methods and the principle of the therapeutic method.

Thus, this international application has three groups of inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N 33/53 C12N 15/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N 33/53 C12N 15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON-LINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-503461 A(リプロジェン インコーポレイテッド) 2003.01.28 & WO 01/01998 A & AU 200058376 A & EP 1191942 A US 6544740 B	1,6-9
A	Nobuhiro Suzumori, Expression of secretory leukocyte protease inhibitor in women with endometriosis, FERTILITY AND STERILITY, <u>vol. 72</u> , no. 5, p. 857-867, 1999	1,6-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.02.2004

国際調査報告の発送日

24.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
上記請求の範囲に係る発明は、人の身体の治療による処置方法に該当する。
2. ☒ 請求の範囲 10, 11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲10及び11に係る発明は、それぞれ「細胞内HRFポリヌクレオチドの発現を抑制する分子」を含んでいるが、前記分子にどのような分子が含まれるのか、明確ではない。
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1, 6-9(発明1)は、ヒスタミン放出因子の発現量を測定することにより、子宮内膜症関連疾患を検査する方法であり、請求の範囲2-4(発明2)は、HRFオリゴヌクレオチド及びその用途であり、請求の範囲10, 11(発明3)は治療薬及び治療方法である。

W094/12881A, W002/22170Aに記載されているように、HRFポリヌクレオチドは、従来より知られている。したがって、HRFポリヌクレオチドは「特別な技術的特徴」とは認められない。また、検査方法の原理と治療方法の原理との間において、共通性は認められない。  
よって、この国際出願には3の発明が含まれている。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第I欄 ニクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**